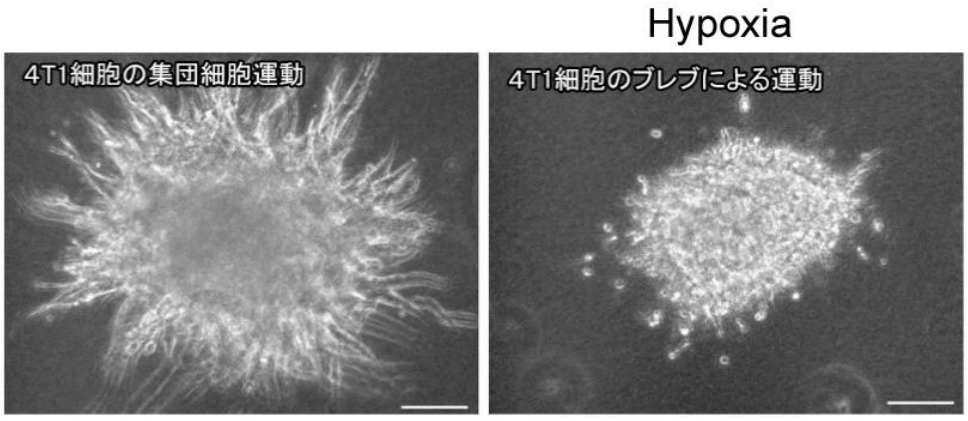
22　癌細胞の運動に関わるブレブ形成制御機構の解明	池ノ内　順一

【目的】癌細胞が遊走性を獲得する機序として、上皮間葉転換現象（Epithelial mesenchymal transition：EMT）以外にも、ブレブと呼ばれる特徴的な細胞膜構造を形成しながら運動するアメーバ運動（Amoeboid Movement）が挙げられる。ブレブを用いた細胞運動は、細胞性粘菌や単細胞アメーバの運動において観察されていたが、脊椎動物ではゼブラフィッシュの始原生殖細胞がブレブを用いて運動することが記載されて以降、様々なヒトの癌細胞がブレブを形成して運動することが報告されるようになった。ブレブは、細胞膜と細胞骨格が脱離することによって生じる細胞膜の突出構造である。ブレブの分子機構や、細胞膜と細胞骨格の相互作用がどのような分子群によって制御されているかについては明らかになっていない。我々は、ヒト大腸癌由来 DLD1 細胞を I 型コラーゲンの上に播種すると顕著にブレブを形成し運動性を獲得することを見出した。本研究課題において、この実験系を用いてブレブの形成・退縮に関わる新規分子の探索、我々がこれまでに見出したブレブの形成機構に関する知見に基づく数理モデルの構築や、癌細胞が低酸素応答に伴ってブレブによる運動能を獲得する分子メカニズムの解明を試みた。

【方法】本研究では、いくつかアプローチによってブレブの分子機構の解明を行った。一つには、DLD1 細胞に GFP タグを付けた遺伝子のライブラリーを発現させて、1 クローンずつライブイメージングで観察することで、ブレブの形成・退縮に伴い興味深い動態を示す分子の探索を行った。二つ目には、我々がこれまでに見出したブレブの形成メカニズムに基づいて、ブレブの動態を記述する数理モデルを構築し、その実験的検証を行った。三つ目には、低酸素応答に伴ってブレブによる遊走能を獲得するマウス肺癌由来の 4T1 細胞を用いて、ブレブの形成を抑制する化合物の探索を行った。

【結果】DLD1 細胞に GFP タグの遺伝子ライブラリーを発現し、ブレブの形成・退縮過程における挙動を観察したところ、拡大中のブレブの細胞質にのみ濃縮する分子を同定した。このタンパク質は拡大中の細胞質に濃縮し、退縮時には細胞質の濃度が減少に転じる。細胞質は均質な溶液であるというこれまでの定説と異なり、拡大中のブレブは他の細胞質領域とタンパク質の組成が異なることが示唆された。また、ブレブを形成した細胞において、細胞質の流動性を調べたところ、急速に細胞膜が変形し拡大する拡大期のブレブの細胞質では他の細胞質領域に比べて流動性が上昇していることが明らかになった。このことは、ブレブの拡大時に、細胞質の流動性を上昇させる制御機構が存在することを示唆している。また、これまでに我々の明らかにしたブレブの分子機構に着目した数理モデルの構築を行い、低分子量 G タンパク質の Rnd3 と RhoA 間の Double negative feedback loop がブレブの形成・退縮の中心的なメカニズムであることを検証した。最後に、低酸素環境下でブレブを形成して浸潤性を獲得する肺癌由来細胞 4T1 細胞を用いて、化合物ライブラリースクリーニングを実施し、ブレブによる運動を抑制する化合物を複数同定した。

低酸素環境下における癌細胞のアメーバ運動



22. 癌細胞の運動に関わるブレブ形成制御機構の解明

池ノ内　順一

九州大学 大学院理学研究院 生物科学部門 代謝生理学研究室

Key words：ブレブ，細胞質不均一性，アメーバ運動，低酸素応答，数理モデル

緒　言

癌細胞が遊走性を獲得する機序として、上皮間葉転換現象（Epithelial mesenchymal transition：EMT）以外にも、ブレブと呼ばれる特徴的な細胞膜構造を形成しながら運動するアメーバ運動（Amoeboid Movement）が挙げられる。ブレブを用いた細胞運動は、細胞性粘菌や単細胞アメーバの運動において観察されていたが、脊椎動物ではゼブラフィッシュの始原生殖細胞がブレブを用いて運動することが記載されて以降、様々ながん細胞がブレブを形成して運動することが報告されるようになった。ブレブは、細胞膜と細胞骨格が脱離することによって生じる細胞膜の突出構造であるが、細胞膜と細胞骨格の相互作用がどのような分子群によって制御されているかについては明らかになっていない。我々は、ヒト大腸癌由来 DLD1 細胞をⅠ型コラーゲンの上に播種すると顕著にブレブを形成し運動性を獲得することを見出した。本研究課題において、ブレブの形成・退縮に関わる新規分子の探索に加えて、我々がこれまでに見出したブレブの形成機構に関する知見に基づく数理モデルの構築や、癌細胞が低酸素応答に伴ってブレブによる運動能を獲得する分子メカニズムの解明を試みた。

方法および結果

1.　ヒト大腸がん由来 DLD1 細胞のブレブによる運動

上皮細胞が癌化し浸潤癌になる過程において、細胞接着の喪失と遊走能の獲得が重要な段階となる。先行研究に於いて、この段階には初期発生の中胚葉や神経堤細胞の発生において観察される EMT が関わっているとして多くの研究が為されてきた。私は、EMT と細胞接着構造との関連に着目して研究を進めてきた。その結果、EMT のマスター転写因子である Snail が細胞接着分子の遺伝子発現を抑制することにより、上皮細胞が遊走性を獲得することを明らかにした［1］。しかし、近年、マウスの体内で人為的に誘導した膵臓がんに於いて、EMT のマスター転写因子 Snail の発現を消失させた場合においても、癌の浸潤や転移能が損なわれないという報告がなされた［2］。このことは癌の転移や浸潤に EMT が必ずしも必要でない場合が存在することを意味している。

2014 年に大腸がん由来の上皮細胞 DLD1 細胞を用いて実験していたときに、DLD1 細胞をプラスチックシャーレに播種したときには安定的な細胞接着を示し上皮細胞のシートを形成するのに対して、Type Ⅰ コラーゲンのゲル中に播種した場合、細胞の接着が崩壊しブレブと呼ばれる特徴的な細胞の形態を示すことに気付いた。さらにブレブを起こした細胞は、細胞外マトリックス内を遊走する能力を示すことを見出した［3］。DLD1 細胞がブレブを形成して遊走性を獲得する際には、EMT と異なり細胞接着分子の遺伝子発現は低下しておらず、またブレブを形成した DLD1 細胞を再びプラスチックシャーレに播種すると元の接着を有する上皮細胞の形態に戻る。このことから、EMT とは異なる機序で癌細胞が細胞接着を喪失し遊走能を獲得するメカニズムとして、ブレブによる細胞運動が重要でないかと考え、ブレブの形成に関わる分子機構の解明を行った。

2.　ブレブの形成・退縮に関わる新規分子の探索

形質膜は常にアクチン細胞骨格によって裏打ちされている。何らかの要因により、形質膜がアクチン細胞骨格の裏打ちから解離すると、形質膜は細胞内圧により膨張し、アクチンの裏打ちを持たない形質膜の球状の突起構造、ブレブが形成される。一旦ブレブが形成されると、ブレブは拡大を続けるが、形質膜直下にアクチン細胞骨格が急速に

再集積し、ブレブの拡大は停止する。その後、ミオシンが形質膜直下に集積し、アクトミオシンの収縮によってブレブは退縮に転じる。このようなブレブの形成・退縮に関わる分子機構を解明する目的で、ブレブを起こしている DLD1 細胞に GFP タグのついた遺伝子ライブラリーを導入して、ブレブの形成・退縮過程における GFP タンパク質の局在を観察し、興味深い挙動を示す分子群の探索を行った。その結果、後述するように２つの低分子量 G タンパク質 Rnd3 と RhoA の相互拮抗作用が、ブレブの形成・退縮の中心的なメカニズムであることを明らかにした［3］。

本研究において、さらにブレブの形成・退縮に関わる新規分子の探索を進めた結果、図 1 に示すようにブレブの細胞質領域に濃縮を示す新規分子など、興味深い挙動を示す分子群を同定することができた。ブレブの細胞質領域に特定のタンパク質が集積するという結果は、「タンパク質は細胞質中を均一に自由拡散する」というこれまでの細胞生物学の定説とは明らかに反する結果である。現在、ブレブの細胞質区画にタンパク質が濃縮するメカニズムや、ブレブの形成における役割の解明を進めている。

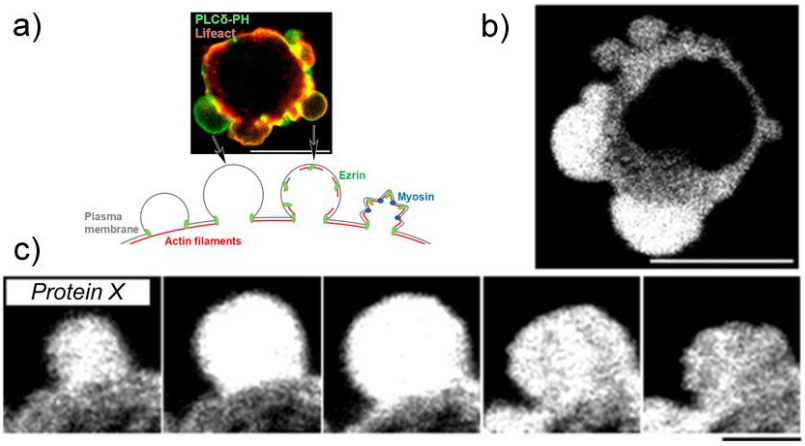


図 1. ブレブの形成・退縮の際に興味深い挙動を示すタンパク質の探索

a）ヒト大腸癌由来培養上皮細胞 DLD1 細胞のブレブ。形質膜を緑色、アクチン細胞骨格を赤色で示している。アクチン皮質を欠く形質膜の球状の細胞膜の突起がブレブである。

b）拡大中のブレブの細胞質領域にのみ局在するタンパク質 X。（スケールバー：10 μ m）

c）ブレブの形成・退縮の過程におけるタンパク質 X の挙動。拡大時の細胞質に濃縮する。（スケールバー：2 μ m）

また、ブレブの拡張期はアクチン細胞骨格に裏打ちされない細胞膜は内圧に従って急速に拡大・変形する。この際に細胞膜の変形に従って細胞質は急速に流入する必要がある。そこでタンパク質組成の異なる拡張期のブレブ細胞質は他の細胞質領域に比較して流動性が高いのではないかと考えた。細胞内に導入した蛍光粒子の追跡実験（図 2）から、確かにブレブの拡大期の細胞質は、退縮期のブレブの細胞質やブレブ以外の細胞質領域に比較して有意に高い流動性を示すことが明らかになった。これより、細胞膜の急激な変形を可能にする細胞質の流動性の制御機構が存在することが明らかになった。現在、ブレブの細胞質区画にタンパク質が濃縮するメカニズムや、細胞質の流動性を制御する分子機構について、解析を進めている。

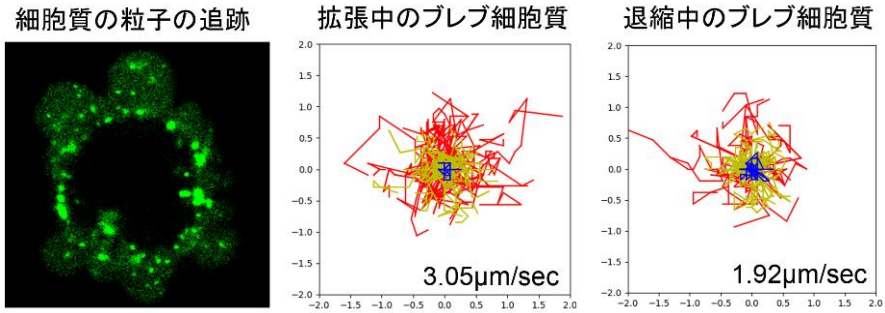


図 2. ブレブの形成・退縮に伴う細胞質の流動性の変化
細胞質の蛍光性粒子を追跡することによって、拡大中のブレブの細胞質領域は、退縮中のブレブの細胞質領域に比べて細胞質の流動性が有意に上昇していることを見出した。

3. ブレブの挙動を説明する数理モデルの構築

上述の通り、我々は、これまでにブレブの形成・退縮に関わる分子機構の解析を進めてきた［3］。ブレブの形成・拡大期において鍵となる分子群として、低分子量 G タンパク質の Rnd3 を同定した。Rnd3 は非常に興味深いことに、アクチン細胞骨格に裏打ちされない拡張期のブレブの形質膜にのみ局在する。詳細な解析の結果、Rnd3 は拡張期のブレブの形質膜において p190B-RhoGAP を活性化し、RhoA の活性を抑制することによって、RhoA-Formin 経路による形質膜直下のアクチン細胞骨格の再集積を阻害し、ブレブの拡大を促進する働きを持つことが我々の研究により明らかになった。一方、退縮期においては、RhoA が活性化し、RhoA によって活性化された ROCK が Rnd3 をリン酸化する。Rnd3 はリン酸化されると 14-3-3 タンパク質に結合して細胞質に移行する性質を持つことが知られており［4］、このため、ROCK の活性化は Rnd3 を形質膜から排除するように働く。このような RhoA と Rnd3 の Double negative feedback 機構によって、RhoA と Rnd3 の活性化の双安定性が保証され、これがブレブの形成・退縮の周期的な繰り返しを可能にするという説を提唱した［3, 5］。

これまでにブレブが形成されて細胞膜が拡大する時期においては低分子量 G タンパク質 Rnd3 が p190B-RhoGAP の活性化を介して RhoA の活性を抑制するのに対して、ブレブが退縮する時期においては、RhoA が活性化されて、ROCK が Rnd3 を直接リン酸化することにより Rnd3 を形質膜から排除するという、RhoA と Rnd3 の相互抑制機構が存在することを明らかにした。この RhoA と Rnd3 の双安定な活性化機構（Bistability）が、ブレブが形成と退縮を繰り返す双安定性の本質であるという説を提唱している。我々のこれまでの知見に基づいて、ブレブの動的な膜変形を説明する数理モデルを構築した（図 3）。これまでに、ブレブのライブイメージングの動画の定量的な解析よりモデル中のパラメーターの数値範囲の絞りこみ、数理モデルの構築に成功した［6］。

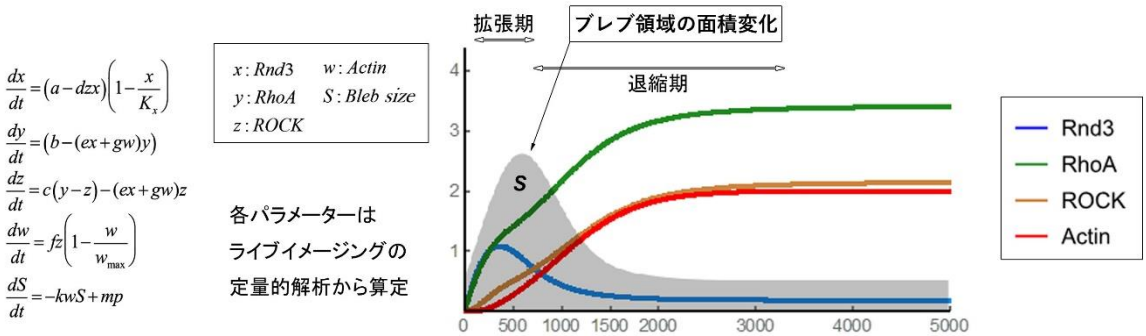


図 3. ブレブの形成・退縮の際に興味深い挙動を示すタンパク質の探索
ブレブの形成・退縮に関わる分子間の相互作用を数式に表現し、ブレブの形成退縮のダイナミクスを再現できるか検証した。

4. 低酸素環境下でブレブによる運動性を獲得する機序の解明

マウス肺がん由来 4T1 細胞は、Matrigel 上で播種すると、細胞塊を形成し、上皮細胞の集団として細胞運動する。この細胞集団を低酸素条件下で培養すると、細胞は接着を失い、ブレブを形成して遊走性を獲得することが報告されている［7］。このような現象は、Collective to amoeboid transition と呼ばれているが、詳細な分子機構は全く明らかになっていない。我々は、この実験系を用いて、ケミカルライブラリーを用いたスクリーニングによって、細胞集団運動からのブレブによるアメーバ運動への転換に関わるシグナル伝達経路を見出した（投稿準備中）。今後はこの現象をライブイメージング解析することによって、ブレブによる遊走性の獲得の途中段階に、上皮細胞から間葉細胞に転換するステップが含まれているか否かなどについて、詳細に解析したい。

考　察

本研究課題では、癌細胞の運動に関わるブレブの分子機構の解明に取り組んだ。ブレブは、2 分程度で拡張と退縮を繰り返す極めて動的な細胞膜構造である。ブレブの形成・退縮の過程で、興味深い挙動を示す分子のスクリーニングを行ったところ、予想外なことに拡大中のブレブの細胞質には特定のタンパク質が濃縮することや、細胞膜の急激な拡大に伴って細胞質の流動性が局所的に拡張中のブレブの細胞質領域において上昇することを見出した。

細胞質流動現象については、アメーバなど様々な生物で研究されている。特に、線虫の受精卵細胞質の原形質流動の方向性が前後軸に沿った極性の確立に寄与することが知られている［8］。また近年の計測技術の進歩により、細胞質に存在する中心体やストレス顆粒などの非膜構造が液－液相分離という概念で理解されるようになってきた。このように細胞質は均一なタンパク質の溶液ではなく、動的で不均一であるという認識が広がりつつある。今回我々が、本研究の過程で、ブレブの解析から見えてきた現象は「細胞内部で局所的に細胞質の流動性を不均一に制御する機構」や「細胞質中で特定のタンパク質の分布を不均一にする機構」が細胞に存在することを意味しており、従来の細胞質を均一なタンパク質の溶液とみなす概念とは相容れない。

細胞質には様々なシグナル伝達経路の構成要素や代謝過程に関わる分子群が混在している。細胞質タンパク質の自由拡散は極めて早いと想定されるにもかかわらず、ブレブの拡大期の細胞質と他の細胞質の領域には明瞭な境界が存在する。効率的なアクチン細胞骨格の再集積など細胞が局所において適切な細胞応答を行うために、「細胞質の区画化」は極めて合理的な戦略である。今後は引き続き、ブレブを研究モデルとして細胞質の区画化に関わる分子機構を解明したい。

また、マウス肺癌由来培養細胞 4T1 細胞を用いて、低酸素環境下においてブレブによる浸潤能を獲得する現象に着目し、特定のシグナル伝達に対する阻害剤が、ブレブによる浸潤能の獲得を抑制することを見出した。今後は、このシグナル伝達経路がどのようにブレブによる細胞運動を抑制するかについて、詳細な分子機構の解明を進めていきたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院理学研究院生物科学部門代謝生理学研究室の博士課程学生の青木佳南である。画像解析は九州大学大学院システム情報科学研究院の内田誠一教授、数理モデルの構築は関西学院大学理工学部生命科学科の巌佐庸教授との共同研究である。

文　献

1） Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. J Cell Sci. 2003 May 15;116(Pt 10):1959-67. Epub 2003 Mar 26.PMID: 12668723 DOI: 10.1242/jcs.00389

2) Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, Wu CC, LeBleu VS, Kalluri R. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. Nature. 2015 Nov 26;527(7579):525-530. Epub 2015 Nov 11. PMID: 26560028 DOI: 10.1038/nature16064.
3) Aoki K, Maeda F, Nagasako T, Mochizuki Y, Uchida S, Ikenouchi J. A RhoA and Rnd3 cycle regulates actin reassembly during membrane blebbing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Mar 29;113(13):E1863-71. Epub 2016 Mar 14. PMID: 26976596 DOI: 10.1073/pnas.1600968113.
4) Riou P, Kjær S, Garg R, Purkiss A, George R, Cain RJ, Bineva G, Reymond N, McColl B, Thompson AJ, O'Reilly N, McDonald NQ, Parker PJ, Ridley AJ. 14-3-3 proteins interact with a hybrid prenyl-phosphorylation motif to inhibit G proteins. Cell. 2013 Apr 25;153(3):640-53. PMID: 23622247 DOI: 10.1016/j.cell.2013.03.044.
5) Ikenouchi J, Aoki K. Membrane bleb: A seesaw game of two small GTPases. Small GTPases. 2017 Apr 3;8(2):85-89. Epub 2016 Jun 17. PMID: 27314434 DOI: 10.1080/21541248.2016.1199266.
6) Aoki K, Satoi S, Harada S, Uchida S, Iwasa Y, Ikenouchi J. Coordinated changes in cell membrane and cytoplasm during maturation of apoptotic bleb. Mol Biol Cell. (in press)
7) Lehmann S, Te Boekhorst V, Odenthal J, Bianchi R, van Helvert S, Ikenberg K, Ilina O, Stoma S, Xandry J, Jiang L, Grenman R, Rudin M, Friedl P. Hypoxia Induces a HIF-1-Dependent Transition from Collective-to-Amoeboid Dissemination in Epithelial Cancer Cells. Curr Biol. 2017 Feb 6;27(3):392-400. Epub 2017 Jan 12. PMID: 28089517 DOI: 10.1016/j.cub.2016.11.057.
8) Kimura K, Mamane A, Sasaki T, Sato K, Takagi J, Niwayama R, Hufnagel L, Shimamoto Y, Joanny JF, Uchida S, Kimura A. Endoplasmic-reticulum-mediated microtubule alignment governs cytoplasmic streaming. Nat Cell Biol. 2017 Apr;19(4):399-406. Epub 2017 Mar 13. PMID: 28288129 DOI: 10.1038/ncb3490.